

Swope, Sheridan

From: Swope, Sheridan
Sent: Friday, December 12, 2003 5:49 PM
To: Slobodyansky, Elizabeth
Subject: 09712338

I have an article that describes purification of the protein in my instant application.
I want to know if they did any peptide sequencing of the purified protein.
From looking at it, I don't think they did. But I'm not sure bc its in Russian.
Would you be willing to take a quick look at it?

Sheridan Swope, Ph.D.
Patent Examiner, AU 1652
Recombinant Enzymes
sheridan.swope@uspto.gov
703-305-1696 (voice)
703-308-3014 (FAX)
Mailbox: CM1 Rm10D01
Office: CM1 Rm12D12

125 33137

Record: 475327

<u>Accession Number</u>	475327
<u>Borrower</u>	Sheridan Swope
<u>Organization</u>	1652
<u>Phone</u>	305-1696
<u>SER</u>	09712338
<u>Request Date</u>	12/12/2003
<u>JRDAT</u>	2879
<u>Document Type</u>	Journal article
<u>Journal Name</u>	BIOKHIMIYA
<u>Journal Location</u>	AGL; NIST; NLM; PTO; TRIDOC
<u>Title</u>	ISOLATION
<u>Author</u>	AZARENKOVA
<u>volume</u>	41
<u>Issue</u>	1
<u>Pages</u>	20-6
<u>Year</u>	1976
<u>Publisher</u>	?, ? : MOSCOW
<u>NOTES</u>	SECOND copy, ex did not get it, 472133
<u>Alternate Source</u>	DL/D 12/12/2003
<u>Workdays</u>	-2879
<u>ISSN</u>	0006-307X

942 547

Material may be protected by copyright law (Title 17, U.S. Code)

УДК 577.156.2

И КАРБОКСИПЕПТИДАЗЫ S ORYZAE

НОВА, А. Я. СТРОНГИН
И НОВ

ский институт генетики
и организмов, Москва

цируемых грибом *Aspergillus* левого фракционирования, гели на амберлите IRC-50, гидролиза в полиакриламидном геле действия на пептидные субстраты, определенный при помощи в присутствии додецилсульфата широкой субстратной специфичности эстеразной активностью. Кислая является металлоферментом, инаксериновых протеиназ и соединенных. По-видимому, фермент серина и цистеина и принадлежит карбоксипептидазам.

посвященные выделению кислых пептидазы, которые обладают широким спектром действия. Кислые пептидазы выделены из орехов фасоли [2], проростков ячменя [5], плесневых грибов рода *Aspergillus* [14]. Характеристика пока ясно, что они относятся к карбоксипептидазам. Высказано предположение, что основная роль может принадлежать специфичности. Не исключают эту функцию, хотя и этой гипотезы пока нет. о и свойствам кислой карбокси-

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА

Кислой карбоксипептидазы (используя завод), представляющий собой смесь карбоксипептидазы [16]. К 4 мл 0,35 мМ ДНФ-прибавляли 1 мл раствора фермента и инкубировали при 37° в течение 10 мин. Активности субстрата его концентрация принимая, что $\epsilon_{280}^{1\%} = 15000$. Реакцию останавливали добавлением 0,2 мл 1 н. НСl. Образовавшийся пептид, содержащий 10% этилового спирта, экстрагировали 4 мл 1%-ного раствора бикарбоната натрия в бикарбонате натрия определенным опытом проводили в тех же

Активность кислой карбоксипептидазы с ДНФ-Gly-Gly-Lys определяли аналогично, используя 0,37 мМ раствор субстрата в 0,1 М ацетатном буфере, pH 5,6.

Активность аминопептидазы определяли по гидролизу L-лейцил-β-нафтиламина [17]. Для колориметрического определения отщепившегося β-нафтиламина применяли сочетание с диазотированным L-анилином [18].

Гидролиз пептидов кислой карбоксипептидазой проводили в течение 18 часов при 37°. К 1 мл пиридин-ацетатного буфера, pH 5,15, содержащего по 100 ммоль каждого пептида, прибавляли 0,1 мл раствора фермента, 1 мл которого имел поглощение при 280 нм 0,350. Реакцию останавливали добавлением 0,2 мл 1 н. НСl до pH 2,0. Раствор упаривали и отщепившиеся аминокислоты определяли в аминокислотном анализаторе Bio-Cal BC-200 (США).

Определение активности кислой карбоксипептидазы по расщеплению карбопептида D,L-Фенилаланина проводили по ранее описанному методу [18].

Определение эстеразной активности по расщеплению метилового эфира N-бензил-L-аргинина проводили спектрофотометрически по изменению поглощения при 258 нм (спектрофотометр DW-2, Aminco). За эстеразную активность по расщеплению метилового эфира ДНФ-Gly-Gly-Arg следили электрофоретически. 10 ммоль метилового эфира ДНФ-Gly-Gly-Arg инкубировали с 0,1 мл фермента ($E_{260} = 0,230$) в пиридин-ацетатном буфере, pH 5,6, в течение 2,5 часов при 37°. Реакцию останавливали добавлением 1 н. НСl до pH 2,0, после чего пробу количественно переносили на электрофореграмму. Электрофорез проводили в пиридин-ацетатном буфере, pH 5,6, в течение 1 часа при градиенте потенциала 45 в/см. Пятна с электрофореграммы вырезали, элюировали 4 мл 1%-ного бикарбоната натрия, и плотность раствора измеряли при 360 нм.

Изоэлектрическое фокусирование в градиенте плотности проводили по методу Вестерберга и Свенссона [19], используя колонку 110 мл (LKB, Швеция). Градиент pH создавали с помощью 1,5–2,0% смеси амфолинов pH 3–5. Изоэлектрофокусирование в 5%-ном полиакриламидном геле проводили в диапазоне pH 3–5 по Ригли [20].

Молекулярный вес фермента определяли электрофорезом в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия. Подвижность белка в геле рассчитывали относительно бромфенолового синего. Для построения калибровочной линии использовали цитохром c, миоглобин, химо tripsиноген, пепсин и овалбумин (хроматографически чистый пепсин получен в нашей лаборатории, все остальные белки фирмы «Serva», ФРГ). Перед опытом белки инкубировали 2 часа при 37° в 0,01 М фосфатном буфере, pH 7,1, содержащем 1%-ный додецилсульфат натрия и 1% меркаптоэтанол. Маркер — бромфеноловый синий — добавляли непосредственно в электродный буфер. Окрашивание гелей проводили 0,3%-ным хумасом голубым GL («Serva», ФРГ) в смеси метанол — вода — ледяная уксусная кислота (50:50:10) в течение ночи после фиксации в течение 1 часа в 10%-ной трихлоруксусной кислоте. Избыток красителя удаляли 7,5%-ной уксусной кислотой.

Выделение кислой карбоксипептидазы. К 50 г орехов прибавляли 350 мл 0,1 М ацетатного буфера, pH 3,9. Смесь подкисляли уксусной кислотой до pH 5,4, центрифугировали при 3000 об/мин и осадок отбрасывали. Все операции по выделению фермента проводили при 5°. К центрифугату при постоянном перемешивании добавляли сернокислый аммоний до 50%-ного насыщения. Осадок отделяли центрифугированием и отбрасывали. Раствор белка диализовали против 0,01 М ацетатного буфера, pH 4,8. При диализе и во всех последующих операциях ко всем растворам добавляли цистеин до конечной концентрации 1 мМ для предотвращения инактивации фермента.

600 мл полученного диализата наносили на колонку с сефадексом G-75 («Pharmacia», Швеция). Колонку (8×70 см) уравнивали и элюировали 0,01 М ацетатным буфером, pH 4,8. Кислая карбоксипептидаза элюировалась сразу же после свободного объема колонки. Основная масса пигментов элюировалась позже. Белок во фракциях определяли при 280 нм в спектрофотометре СФ-4.

На колонку с амберлитом IRC-50 (4,5×25 см), уравнированную 0,01 М ацетатным буфером, pH 4,8, наносили 1400 мл раствора белка, полученного на предыдущей стадии. Колонку промывали 1 л 0,01 М ацетатного буфера, pH 4,8, и карбоксипептидазу элюировали 0,5 М ацетатным буфером, pH 5,6. Элюат (1500 мл) концентрировали в 100 раз ультрафильтрацией («Amicon», Голландия) через мембрану UM-10 и обессоливали на колонке с сефадексом G-25. К полученному раствору белка добавляли 0,2 М фосфатный буфер, pH 6,85, до конечной концентрации 0,001 М и 10 мл раствора наносили на колонку (3×10 см) с гидроксилатитом, который был получен по методике Анакера и Стой [21]. Колонка была уравновешена 0,001 М фосфатным буфером, pH 6,85. Элюцию белка проводили ступенчато: 0,001—0,005—0,01—0,05 М фосфатным буфером, pH 6,85.

Фракции, которые были элюированы 0,05 М фосфатным буфером, pH 6,85, в двух параллельных опытах объединяли (440 мл), обессоливали и наносили на колонку (3×18 см) с ДЭАЭ-целлюлозой («Whatman» DE-32), уравнированную 0,01 М ацетатным буфером, pH 5,6. Элюцию проводили градиентом концентрации (0,1—0,5 М) ацетатного буфера, pH 5,6. Фракции с карбоксипептидазной активностью (320 мл) собирали, обессоливали и концентрировали до 8 мл.

Дальнейшую очистку проводили с помощью электрофореза в полиакриламидном геле при pH 5,5 (300—500 мкг белка на гель размером 6×60 мм). Контрольный гель

разрезали на 20 сегментов (по 3 мм), в которых определяли карбоксипептидазную активность. Сегмент, содержащий активный фермент, вырезали из 60 параллельных гелей, измельчали и фермент элюировали 45 мл 0,1 М ацетатного буфера, pH 5,6, в течение ночи при 4° при постоянном перемешивании. Экстракцию ацетатным буфером повторяли трижды. Все экстракты объединяли, концентрировали ультрафильтрацией через мембрану UM-10 и хранили при -20°. В результате проведенной очистки получено 13 мг кислой карбоксипептидазы. При выделении фермента мы не применяли лиофильную сушку, поскольку она вызывала заметную инактивацию. Потеря активности при лиофилизации отмечена также при выделении кислой карбоксипептидазы из пекарских дрожжей [5].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В табл. 1 представлен ход очистки кислой карбоксипептидазы из оризина, представляющего собой смесь ферментов, продуцируемых грибом *Asp. oryzae*.

Таблица 1

Очистка кислой карбоксипептидазы из *Asp. oryzae*

Стадии выделения	Общий белок, E ₂₈₀	Активность		Оч. ст. ка	Выход, % по активности
		общая, мкмоль ДНФ-Gly-Gly	удельная, мкмоль расщепившегося субстрата/E ₂₈₀ /мин		
Исходный раствор	32 840	5578	0,002	1	100
50%-ное насыщение сульфатом аммония	29 000	5888	0,003	1,4	105,5
Гель-фильтрация на сефадексе G-75	8 700	3764	0,0093	4	67,5
Хроматография на амберлите IRC-50	2 120	3508	0,018	8,4	65
Концентрирование, обессоливание	1 826	3328	0,03	12,8	60
Хроматография на гидроксиллапатите	330	628	0,031	13,5	11,3
Хроматография на ДЭАЭ-целлюлозе	57	340	0,1	42,8	6
Концентрирование, обессоливание	46,8	332	0,12	50	5
Электрофорез в полиакриламидном геле	13	403	0,43	57	1,8

Осаждение сульфатом аммония при 50%-ном насыщении позволило отделить лишь часть сопутствующих белков и даже при 90%-ном насыщении сульфатом аммония в надосадочной жидкости сохранялось 50% карбоксипептидазной активности. Поэтому для отделения основного количества пигментов и балластных белков применяли фильтрацию через сефадекс G-75 и хроматографию на амберлите IRC-50, после чего экстракт фермента концентрировали ультрафильтрацией. Хроматографический раствор фермента концентрировали ультрафильтрацией. Хроматографией на гидроксиллапатите при pH 6,85 (рис. 1) удалось отделить основную массу сопутствующего фермента — лейцинаминопептидазы, которая по своим физико-химическим свойствам близка карбоксипептидазе. Окончательное отделение лейцинаминопептидазы достигнуто последующей хроматографией на ДЭАЭ-целлюлозе при pH 5,6 (рис. 2). В результате получен препарат, который при электрофорезе в полиакриламидном геле (pH 5,5) давал четыре полосы, наиболее интенсивная из которых соответствовала карбоксипептидазе, что дало возможность применить электрофорез в полиакриламидном геле как заключительную стадию очистки. Из 50 г исходного препарата оризина получено 13 мг кислой карбоксипептидазы. В этом препарате обнаружена одна полоса при электрофорезе в полиакриламидном геле при pH 5,5 и 9,5 (рис. 3).

Изoeлектрическая точка кислой карбоксипептидазы, найденная изoeлектрофокусированием, находится при pH 4,4. Молекулярный вес фермента определяли при помощи электрофореза в полиакриламидном геле

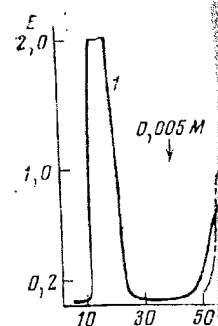


Рис. 1. Хроматография

Колонку (3×10 см) уравновесили, элюцию проводили, изменяя pH, pH 6,85 (указано стрелой); 2 — активность карбоксипептидазы (E₂₈₀); 3 — активность

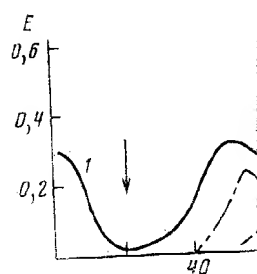


Рис. 2. Хроматография

Колонку (3×18 см) уравновесили, элюцию градиентом концентрации указали

в присутствии додецилсульфата карбоксипептидазы, расположено соответствует молекулярному

Оптимальное действие кислой карбоксипептидазы на субстрат ДНФ-Gly-Gly-Arg находится при pH 4,0, по оптимальному действию от карбоксипептидазы [7] и *Asp. oryzae* [6, 11—13].

При 37° фермент наиболее активен при pH 3,5 и 8,0. Фермент ингибируется за 10 мин инкубации на 20%, при 60° фермент

Выделенный фермент из растительных источников действует на субстрат и N-замещенных дипептидов. Фермент особенно легко отщепляет основные аминокислоты

рых определяли карбоксипептидазную фермент, вырезали из 60 параллельных 0,1 М ацетатного буфера, pH 5,6, в течение 10 мин. Экстракцию ацетатным буфером концентрировали ультрафильтрацией. В результате проведенной очистки полученный фермент мы не применяли лиофильную инактивацию. Потеря активности и кислой карбоксипептидазы из пекар-

ОБСУЖДЕНИЕ

кислой карбоксипептидазы из грибов, продуцируемых грибом

Таблица 1

казы из *Asp. oryzae*

Активность		Очистка	Выход, % по активности
акт. ая, мкмоль Ф-Gly-Gly	удельная, мкмоль расщепленного субстрата / E ₂₅₀ /мин		
5578	0,002	1	100
5888	0,003	1,4	105,5
3764	0,0093	4	67,5
3508	0,018	8,4	65
3328	0,03	12,8	60
628	0,031	13,5	11,3
340	0,1	42,8	6
332	0,12	50	5
103	0,13	57	1,8

50 %-ном насыщении позволило фракционировать и даже при 90 %-ном насыщении жидкости сохранялось 50 % фермента для отделения основного компонента. Применяли фильтрацию через амберлит IRG-50, после чего графитированием. Хроматография (рис. 1) удалось отделить основную фракцию карбоксипептидазы, которая по физическим свойствам карбоксипептидазы. Окончательно достигнута последующей при pH 5,6 (рис. 2). В результате разреза в полиакриламидном геле не интенсивная из которых соотносительная возможность применить электрофорезную стадию очистки получено 13 мг кислой карбоксипептидазы, найденная изолята при pH 4,4. Молекулярный вес фермента в полиакриламидном геле

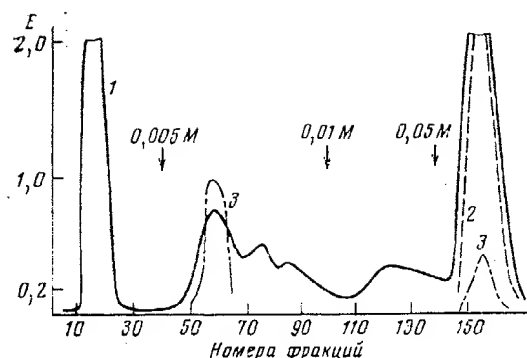


Рис. 1. Хроматография кислой карбоксипептидазы на гидроксилапатите

Колонку (3×10 см) уравнивали 0,001 М фосфатным буфером, pH 6,85. Элюцию проводили, изменяя ступенчато концентрацию фосфатного буфера, pH 6,85 (указано стрелками). Объем фракций — 5,8 мл. 1 — белок (E₂₅₀); 2 — активность карбоксипептидазы по расщеплению ДНФ-Gly-Gly-L-Arg (E₃₆₀) и 3 — активность лейцинаминопептидазы по β-нафтиламиду L-лейцина

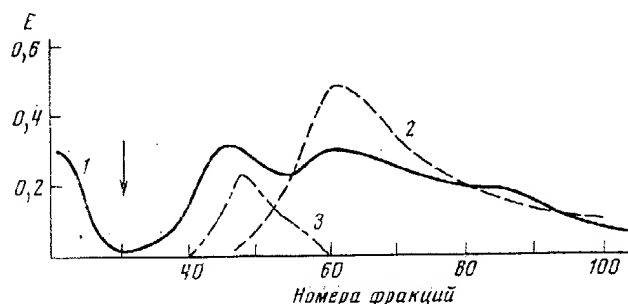


Рис. 2. Хроматография кислой карбоксипептидазы на ДЭАЭ-целлюлозе

Колонку (3×18 см) уравнивали 0,01 М ацетатным буфером, pH 5,6. Элюцию проводили, изменяя градиентом концентрацию ацетатного буфера (0,1—0,5 М). Начало градиента указано стрелкой. Обозначения — см. подпись к рис. 1

в присутствии додецилсульфата натрия. Зона, соответствующая кислой карбоксипептидазе, расположена между овальбумином и пенцином, что соответствует молекулярному весу ~37 000 (рис. 4).

Оптимум действия кислой карбоксипептидазы по расщеплению ДНФ-Gly-Gly-Arg находится при pH 5,0, а по расщеплению карбокси-окси-Glu-Tyr — при pH 4,0. Выделенный фермент несколько отличается по оптимуму действия от карбоксипептидаз, выделенных из *Asp. saitoi* [7] и *Asp. oryzae* [6, 11—13].

При 37° фермент наиболее стабилен при pH 5,0 и быстро инактивируется при pH 3,5 и 8,0. Фермент мало устойчив к повышению температуры: за 10 мин инкубации при pH 5,0 и 50° активность фермента снижается на 20%, при 60° фермент полностью инактивируется.

Выделенный фермент подобно кислым карбоксипептидазам из других источников растительного происхождения обладает широким спектром действия. Он отщепляет от карбоксильного конца белков, пептидов и N-замещенных дипептидов ряд аминокислот, включая пролин (табл. 2). Фермент особенно легко отщепляет ароматические аминокислоты, а также основные аминокислоты — лизин и аргинин. С наибольшим трудом

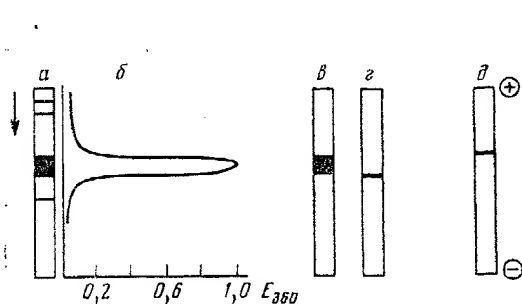


Рис. 3

Рис. 3. Электрофорез кислой карбоксипептидазы в полиакриламидном геле

а — кислая карбоксипептидаза после хроматографии на ДЭАЭ-целлюлозе (рН 5,5; 50–100 мкг белка на гель); б — определение карбоксипептидазной активности в сегментах геля по расщеплению ДНФ-Gly-Gly-L-Arg; в — электрофорез препарата, выделенного электрофорезом (рН 5,5; 500–100 мкг белка на гель); г — то же (рН 9,5; 30 мкг белка на гель); д — изоэлектрофокусирование в геле (рН 3–5) фермента, выделенного электрофорезом (50 мкг белка на гель). Направление разделения указано стрелкой

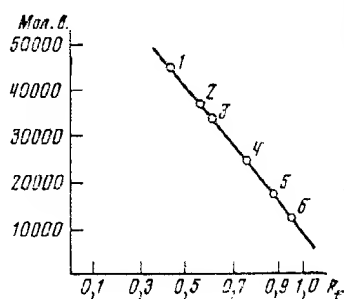


Рис. 4

Рис. 4. Определение молекулярного веса кислой карбоксипептидазы при помощи электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия

1 — овальбумин, 2 — кислая карбоксипептидаза, 3 — пепсин, 4 — химотрипсиноген, 5 — миоглобин, 6 — цитохром с

карбоксипептидаза отщепляет глицин и пролин, особенно, если они соседствуют в полипептидной цепи. Так, фермент отщепляет пролин и глицин от бензил-Phe-Pro и ацетил-Phe-Gly, но не гидролизует карбо-бензокси-Gly-Pro и карбобензокси-Gly-Gly. Карбоксипептидаза не гидролизует свободные дипептиды, но легко отщепляет тирозин от трипептида Gly-Glu-Tyr. При гидролизе 12-членного пептида химотрипсинового гидролизата фрагмента В2 свиного пепсина (Glu-Thr-Ile-Gly-Ile-Gly-Thr-Pro-Ala-Gln-Asp-Phe) фермент последовательно отщепляет с С-конца четыре аминокислоты, но не гидролизует связь треонин — пролин. Фермент способен гидролизовать только истинные пептидные связи и не гидролизует карбонафтокси-фенилаланин, который является хорошим субстратом для карбоксипептидазы А. Выделенная карбоксипептидаза не обладает эстеразной активностью и не гидролизует метиловый эфир N-бензил-L-аргинина и метиловый эфир ДНФ-Gly-Gly-Arg как при рН 5,0, так и при рН 7,2 и 8,0. Этим свойством фермент отличается от карбоксипептидаз из *Asp. saitoi* [7], проростков семян хлопка [4] и пекарских дрожжей [5], которые способны гидролизовать эфирные субстраты. По данным японских авторов [6, 11–13], I–IV карбоксипептидазы из *Asp. oryzae* очень медленно гидролизуют эфирные субстраты. Кислая карбоксипептидаза, выделенная нами, не гидролизует амид N-бензил-L-аргинина.

Данные о влиянии различных ингибиторов и ионов двухвалентных металлов на кислую карбоксипептидазу представлены в табл. 3. Метал-

Таблица 2

Гидролиз пептидных субстратов карбоксипептидазой
В пробе 100 нмоль пептида, рН 5,15

Субстраты	Отщепилось аминокислоты, нмоль	Субстраты	Отщепилось аминокислоты, нмоль
Cbz-Clu-L-Tyr	99	Ac-D,L-Phe-D,L-Val	47
Bz-L-Phe-L-Arg	86	Gly-Clu-L-Tyr	40
Ac-D,L-Phe-Gly	83	Cbz-Gly-Gly	0
Ac-D,L-Phe-D,L-Phe	51	Cbz-Gly-L-Pro	0
Bz-D,L-Phe-L-Pro	45	Leu-Gly-Gly	0

Влияние различных реагентов

Реагент

ЭДТА
8-оксихинолин
n-XMB
Йодацетат натрия

ДФФ

Фенилметилсульфонилфторид
ZnSO₄
MgSO₄
CaCl₂
MnCl₂
Cu(CH₃COO)₂
Pb(CH₃COO)₂
Hg(CH₃COO)₂
FeSO₄

Сравнительная характеристика

Источник выделения

Карбоксипептидаза из оризина
Карбоксипептидаза из цитрусовых
Карбоксипептидаза из проростков ячменя
Карбоксипептидаза из листьев фасоли
Карбоксипептидаза из семян хлопка
Карбоксипептидаза из пекарских дрожжей
Карбоксипептидаза из *Asp. saitoi*
Карбоксипептидаза I из *Asp. oryzae*
Карбоксипептидаза II из *Asp. oryzae*
Карбоксипептидаза III из *Asp. oryzae*
Карбоксипептидаза IV из *Asp. oryzae*
Пенициллокарбоксипептидаза из *Penicillium janthinellum*

* Молекулярный вес определяли с помощью додецилсульфата натрия, в остальных случаях — по другим методам.

лосвязывающие агенты — ЭДТА и цитрат натрия. Очевидно, что карбоксипептидазы А и В не активируются ионами двухвалентных металлов в активном центре. Ионы Pb²⁺ также не влияют на активность фермента на 50%, а ионы Cu²⁺ снижают активность фермента на 50%. Реагенты на SH-группы, так как натриевая соль йодуксусной кислоты, почти полностью ингибируют фермент. Эти данные являются для активности кислой карбоксипептидазы. Ингибиторы сериновых протеиназ: диизопропилфторфосфат, диизопропилфторфосфат, фермента, а фенилметилсуль-

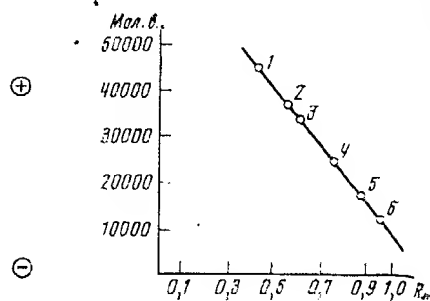


Рис. 4

пептидазы в полиакриламидном геле на ДЭАЭ-целлюлозе (рН 5,5; 50—100 мкг белковой активности в сегментах геля по расщеплению зеленого электрофорезом (рН 5,5; 500—100 мкг на гель); 8 — изоэлектрофокусирование в геле мкг белка на гель). Направление разделения вправо

слой карбоксипептидазы при помощи присутствия додецилсульфата натрия пепсин, 4 — химотрипсиноген, 5 — миоглобин, 6 —

и пролин, особенно, если они со-
с, фермент отщепляет пролин и
he-Gly, но не гидролизует карбо-
-Gly. Карбоксипептидаза не гидро-
лизует тирозин от трипеп-
пептида химотрипсина пепсина (Glu-Thr-Ile-Gly-Ile-Gly-
медоватно отщепляет с С-кон-
олизует связь треонин — пролин.
ю истинные пептидные связи и не
нин, который является хорошим
Выделенная карбоксипептидаза
не гидролизует метиловый эфир
ир ДНФ-Gly-Gly-Arg как при рН
ством фермент отличается от кар-
стков семян хлопка [4] и пекар-
дролить эфирные субстраты.
13]. I—IV карбоксипептидазы из
уют эфирные субстраты. Кислая
не гидролизует амид N-бензоил-L-

абиторов и ионов двухвалентных
у представлены в табл. 3. Метал-

Таблица 2

ов карбоксипептидаз
моль пептида, рН 5,15

Субстраты	Отщепилось аминокислот, нмоль
D,L-Phe-D,L-Val	47
Glu-Tyr	40
Gly-Gly	0
Gly-L-Pro	0
Gly-Gly	0

Влияние различных реагентов на активность кислой карбоксипептидазы

Реагент	Концентрация, М	Время ингибиро- вания, часы	рН	Остаточная активность, %
ЭДТА	$5 \cdot 10^{-3}$	1	5,0	100
8-оксихинолин	10^{-3}	0,5	5,6	110
n-XMB	10^{-3}	1	7,4	6,8
Йодацетат натрия	$4 \cdot 10^{-3}$	1	5,0	6,6
		0,5	5,0	3,0
		1	7,4	4,0
		0,5	7,4	6,0
ДФФ	$4 \cdot 10^{-3}$	1	7,4	2,6
		1	5,6	3,8
Фенилметилсульфонилфторид	10^{-3}	1	5,0	20
ZnSO ₄	10^{-4}	1	5,6	90
MgSO ₄	10^{-4}	1	5,6	100
CaCl ₂	10^{-4}	1	5,6	92
MnCl ₂	10^{-4}	1	5,6	93
Cu(CH ₃ COO) ₂	10^{-3}	1	5,0	15
Pb(CH ₃ COO) ₂	10^{-3}	1	5,0	97
Hg(CH ₃ COO) ₂	10^{-3}	1	5,0	2
FeSO ₄	10^{-3}	1	5,0	56

Таблица 4

Сравнительная характеристика класса кислых карбоксипептидаз

Источник выделения	Оптимум рН	Гидролиз эфиров	Инактивация			Мол. в.
			ЭДТА	n-XMB	ДФФ	
Карбоксипептидаза из орнзина	5,0	—	—	+	+	37 000*
Карбоксипептидаза из цитрусовых	5,3—5,7	+	—	—	+	148 700
Карбоксипептидаза из проростков яч- меня	5,2	+	—	+	+	90 000
Карбоксипептидаза из листьев фасоли	5,6	—	—	—	+	—
Карбоксипептидаза из семян хлопка	5,8	+	—	—	+	84 500
Карбоксипептидаза из пекарских дрожжей	5,0	+	—	+	+	61 000
Карбоксипептидаза из <i>Asp. saitoi</i>	3,1—3,5	+	—	+	—	155 000
Карбоксипептидаза I из <i>Asp. oryzae</i>	3,0	±	—	+	+	120 000
Карбоксипептидаза II из <i>Asp. oryzae</i>	3,0	±	—	+	+	105 000
Карбоксипептидаза III из <i>Asp. oryzae</i>	3,0	±	—	+	+	61 000
Карбоксипептидаза IV из <i>Asp. oryzae</i>	3,0	±	—	+	+	43 000
Пенициллокарбоксипептидаза из <i>Pe- nicillium janthinellum</i>	4,0—5,0	—	—	+	+	48 000

* Молекулярный вес определяли с помощью электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия, в остальных случаях — при помощи гель-филтрации на сефадексе G-100.

лосвязывающие агенты — ЭДТА и 8-оксихинолин — не ингибируют ак-
тивность фермента. Очевидно, что в отличие от панкреатических карбо-
ксипептидаз А и В кислая карбоксипептидаза не содержит ионов двух-
валентных металлов в активном центре. Ионы Zn^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Ca^{2+} ,
 Pb^{2+} также не влияют на активность фермента. Ионы Fe^{2+} ингибируют
фермент на 50%, а ионы Cu^{2+} и Hg^{2+} являются сильными ингибиторами.
Реагенты на SH-группы, такие, как n-хлормеркурибензоат (n-XMB) и
натриевая соль йодуксусной кислоты, ингибируют активность фермента
почти полностью. Эти данные указывают на то, что SH-группы сущест-
венны для активности кислой карбоксипептидазы из *Asp. oryzae*. Инги-
биторы сериновых протеиназ являются сильными ингибиторами фермен-
та: диизопропилфторфосфат (ДФФ) полностью ингибирует активность
фермента, а фенилметилсульфонилфторид — на 80%.

